八字地老虎血球细胞系的建立

李长友[1]，郑桂玲[1]，王晓云[1]，宋　捷[1]　李国勋[2]
（1.东北农业大学农学院植物保护系，哈尔滨　150030；2.河北农业大学植物保护系，保定　071001）

摘要：由八字地老虎 *Xestia c-nigrum* 血细胞建立了一株细胞系，命名为 NEAU-Xc-960716H，原代培养 90 余天，现已传至 70 余代。细胞多为圆形，部分梭形，细胞群体倍增时间约为 63 h。具有典型的鳞翅目昆虫染色体特征，数量多，形态为短杆状和球形。酯酶同工酶谱为 5 条主带，与同种昆虫（八字地老虎）的胚胎细胞系（NEAU-Xc-730E）酯酶图谱稍有不同，而与草地夜蛾细胞系（IPLB-SF-21）的酯酶图谱完全不同。该细胞系可以被八字地老虎核型多角体病毒 XcNPV 感染，但感染率较低。

关键词：八字地老虎；细胞系；血细胞
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）02-0279-04

Establishment of a cell line from the hemocytes of *Xestia c-nigrum* L.（Lepidoptera：Noctuidae）

LI Chang-You[1]，ZHENG Gui-Ling[1]，WANG Xiao-Yun[1]，SONG Jie[1]，LI Guo-Xun[2]（1.Department of Plant Protection，Northeast Agricultural University，Harbin　150030，China；2.Department of Plant Protection，Hebei Agricultural University，Baoding　071001，China）

Abstract：A new insect cell line，NEAU-Xc-960716H，was established from *Xestia c-nigrum* larval hemocytes through successive passage over 70 generations since July 1996. The cells were classified into two types：spherical and spindle. The population doubling time of the cell line was about 63 hours. The chromosomes were condensed short rods and round，typical in lepidopteran cell lines. The isozyme pedigree of esterase was different from the embryonic cell lines NEAU-Xc-730E of *Xestia c-nigrum* and IPLB-SF-21. The cell line was susceptible to *Xestia c-nigrum* nuclear polyhedrosis virus（XcNPV），although at a low level.

Key words：*Xestia c-nigrum*；cell line；hemocyte

昆虫的组织培养最早始于 1915 年，直到 1962 年由 Grace 成功地建立起世界上第一个昆虫细胞系——桉蚕卵巢细胞系（Grace，1962），此后昆虫细胞系的建立工作在世界范围内广泛展开，不断有新昆虫细胞系建成的报道（Li *et al*.，1998；谢天恩等，1980）。昆虫组织培养已在细胞生物学、分子生物学、昆虫学、病毒学、生物化学、遗传学等领域的研究工作中发挥着重要作用。有关八字地老虎 *Xestia c-nigrum* Linnaeus 血球细胞系的建立国内外尚未见报道，我们从 1996 年 7 月开始建立八字地老虎血球细胞系，并对细胞系的一些特性进行了研究。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

从黑光灯下诱集八字地老虎成虫，在室内饲以 5%的蜂蜜水，产卵后，收集卵粒，2%次氯酸钠消毒 5 min，无菌水冲洗，灭菌滤纸吸干水分，放入罐头瓶中，置于 23℃培养箱中，待幼虫孵化后，饲喂灰菜，挑选 5～6 龄幼虫，作为细胞培养的虫源。

1.2　细胞系和培养基

八字地老虎胚胎细胞系 NEAU-Xc-730E 为本研究室保存，草地夜蛾卵巢细胞系 IPLB-SF-21（SF-21）由中山大学害虫生物防治国家重点实验室提

基金项目：国际科学基金（C/2531-1）和河北农业大学资助项目（9816）
第一作者简介：李长友，男，1969 年 11 月生，博士，副教授，研究方向为害虫微生物防治，E-mail：licy99@0451.com；licy99@263.net
收稿日期 Received：2000-01-26；接受日期 Accepted：2000-10-19

供。

采用TC-100培养基（GIBCO公司），辅以15%的小牛血清。

1.3 原代培养

选择5龄八字地老虎幼虫，饥饿12 h，将幼虫置于2%次氯酸钠中10 min，再移至70%乙醇溶液中10 min进行体表消毒，用灭菌的三蒸水冲洗3次，将幼虫放在灭菌的滤纸上吸干水分，剪断幼虫腹足，血淋巴滴入装有2 mL培养液的培养瓶中，每瓶2滴血淋巴，然后置于27℃培养箱中培养，每周更换半量培养基。待新细胞铺满瓶底后开始传代。

1.4 细胞生长曲线的测定

取传至第30代的细胞，悬浮计数后用培养基稀释细胞浓度为1×10^5/mL，分装于20个培养瓶中，每瓶2.5 mL，此时为时间零的浓度，在27℃条件下培养，每天取出2瓶细胞，用血球计数板计数，每瓶细胞计数3次，共计数6次，取其平均值，连续计数10天，绘出细胞生长曲线图，并计算其群体倍增时间。

1.5 染色体分析

以秋水仙素处理对数生长期的细胞，使秋水仙素的终浓度为1 μg/mL，继续培养18 h，将细胞移入5 mL离心管中，1 000 r/min离心10～15 min，细胞沉淀，除去上清液，加入双重蒸馏水1 mL，在室温下低渗处理10 min，再加入1 mL三蒸水，低渗10 min，加入固定液（甲醇∶冰醋酸＝3∶1）0.5 mL处理5 min，离心后去上清，再加入固定液3 mL悬浮细胞，将细胞悬液滴在预冷的载玻片上，晾干，然后用Giemsa染液染色，制片观察。

1.6 酯酶分析

取对数生长期的细胞，1 000 r/min离心10 min，去上清后，加入样品缓冲液，利用超声波裂解细胞，4℃下8 000 r/min离心5 min，取上清液，以此为电泳样品。电泳缓冲液为Tris-甘氨酸，聚丙烯酰胺凝胶浓度为6.25%，电泳在4℃冰箱内进行，电泳后染色，显色液为40 mg α-萘酯醋酸和40 mg β-萘酯醋酸溶于5 mL丙酮中，再加入60 mg坚牢蓝RR，待溶后加入45 mL 0.1 mol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）。以草地夜蛾卵巢细胞系SF-21作为标准，计算各谱带的相对迁移率。

1.7 病毒侵染试验

以浓度4.3×10^6多角体/mL的八字地老虎核型多角体病毒接种4龄八字地老虎幼虫，将发病幼虫用75%的酒精消毒10 min，无菌水冲洗，收集病虫血淋巴于离心管中，经3 000 r/min离心10 min，上清液经0.45 μm的滤器过滤，所得滤液作为毒源感染对数生长期细胞。以细胞内形成多角体的确认为感染，用血球计数板在显微镜下计算形成多角体的细胞数，确定细胞感染率。

2 结果与分析

2.1 细胞培养

该细胞系从1996年7月进行原代培养，细胞形态多种，24 h后细胞开始贴壁，培养1周后细胞逐渐拉网，1个月后开始有细胞分裂，逐渐铺满瓶底，3个月后进行传代培养。细胞多为圆形，部分为梭形（图版Ⅰ）。现在已传至70余代，细胞生长良好。将该细胞系命名为NEAU-Xc-960716H。

2.2 细胞生长曲线

细胞数量的增长最初有一个缓慢的增殖过程，然后迅速增加，培养到第7天达到最大值，之后细胞数量开始下降，细胞聚堆，细胞开始破裂（图1）。经计算，细胞的群体倍增时间为63 h。

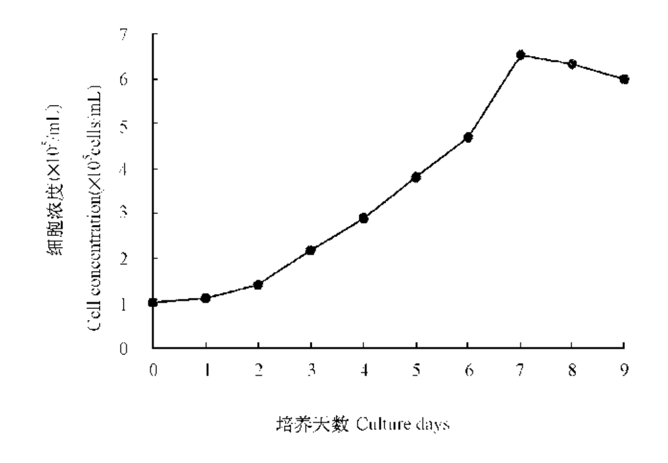


图1 八字地老虎血球细胞系（NEAU-Xc-960716H）的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of the cell line from *Xestia c-nigrum* hemocyte（NEAU-Xc-960716H）

2.3 染色体分析

在光学显微镜下观察细胞的染色体均呈短棒状和球形，染色体聚集，数量多（图2），与Marks（1980）提到的鳞翅目昆虫细胞染色体特征符合，不易准确统计染色体的数目。

2.4 酯酶分析

酯酶电泳分析发现，血球细胞系（NEAU-Xc-960716H）与同源的八字地老虎胚胎细胞系

（NEAU-Xc-730E）的酯酶图谱各有 5 条带，其中有 4 条带迁移率一致，两者只有一条带不同，说明两株细胞系的酯酶图谱有细微差别，可以通过酯酶图谱区别两种细胞系，二者与草地夜蛾卵巢细胞系（IPLB-SF-21）的谱带完全不同（图 3），各条谱带的迁移率见表 1。

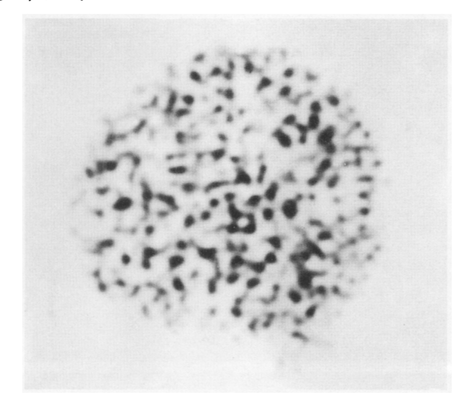


图 2　八字地老虎血球细胞系的染色体（2 000 ×）

Fig. 2　Chromosomes of NEAU-Xc-960716H cells

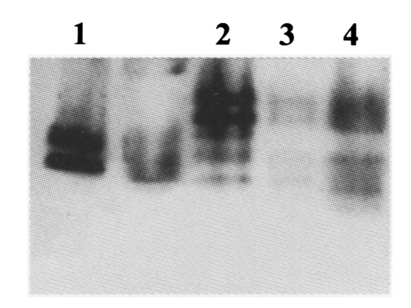


图 3　三种细胞系酯酶电泳图谱

Fig.3　The esterase patterns of three cell lines

1. 草地夜蛾卵巢细胞系（LPLB-SF-21）；

2. 八字地老虎胚胎细胞系（NEAU-Xc-730E）；

3、4. 八字地老虎血球细胞系（NEAU-Xc-960716H）

表 1　三种细胞系酯酶各谱带的相对迁移率

Table 1　The relative mobility of esterases of three cell lines

细胞系 Cell line designation	相对迁移率 Relative mobility					
IPLB-SF-21			100	115		
NEAU-Xc-730E	72	83	98	113	124	
NEAU-Xc-960716H	72	83		113	124	138

2.5　病毒侵染试验

本组建立的血球细胞系可以被八字地老虎核型多角体病毒侵染，接种病毒后 5 天发现感染的细胞核膨大，7 ~ 8 天细胞核内有病毒多角体形成，10 天后感染细胞破裂，多角体释放出来。但细胞感染率较低，只有 1%。

3　讨论

在该细胞系建立过程中，首先细胞拉网、聚堆，然后从网中分裂出新细胞，但最初分裂的细胞量较少，不易传代成功，分瓶时间不长细胞破裂，培养 3 个月后，分裂出来的细胞不断增多，待细胞铺满瓶底后开始传代培养，刚传出的细胞生长缓慢，到第 4 ~ 5 代时，细胞生长比较稳定。细胞也由原来的多种类型到大多数的圆形细胞和少数的梭形细胞。Sohi（1979）认为昆虫组织和细胞的离体培养是非常困难的，而昆虫血细胞的离体培养比其它昆虫组织还要困难。所以，我们在培养过程中注意了以下几个问题。首先在建系时要有尽量多的接种量，保证细胞的量。其次经常观察细胞的生长状况，及时调整培养基的渗透压。另外培养基的及时更换对细胞的生长也有一定影响。该细胞系能够被同源的八字地老虎核型多角体病毒侵染，但细胞感染率极低，需要进一步对该细胞系进行克隆，筛选对病毒敏感的纯系。

参　考　文　献（References）

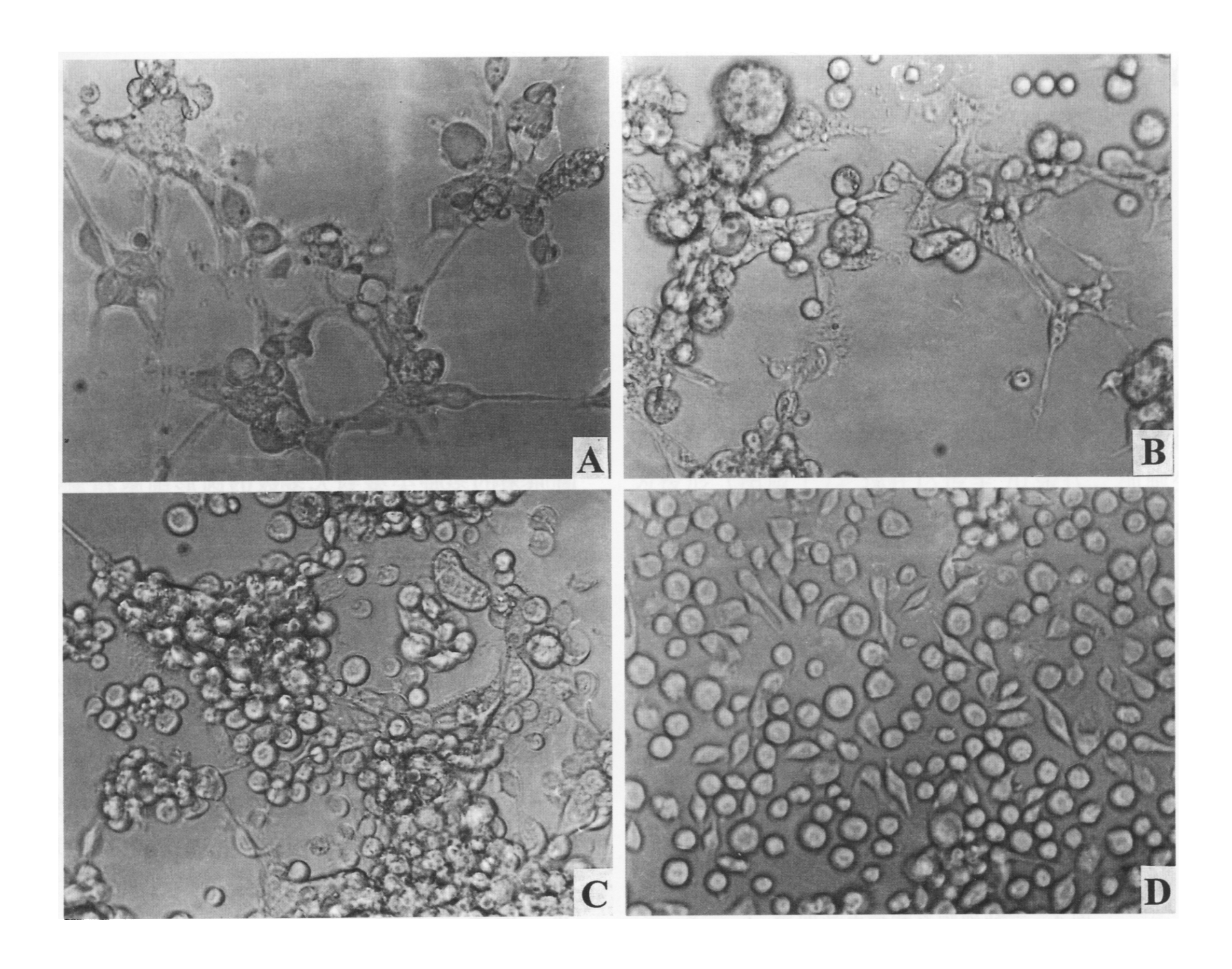
Grace T D C, 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 173: 1 134 - 1 135.

Li G X, Yu H C, Song J, Li C Y, Wang X Y, 1998. New cell line from embryos of *Mythimna separata*. *Entomologia Sinica*, 5 (1): 89 - 94.

Xie T E, Lan P Z, Zhang G Y, 1980. The culture of hemocytes from *Heliothis armigera* Hübn. *Chinese Science Bulletin*, 25 (5): 232 - 233. [谢天恩，兰萍章，张光裕，1980. 棉铃虫 *Heliothis armigera* Hübn. 血球细胞单层培养. 科学通报, 25 (5): 232 - 233]

Marks E P, 1980. Insect tissue culture: an overview 1971 - 1978. *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 73 - 101.

Sohi S S, 1979. Hymocyte cultures and insect hemocytology. In: Gupta A P ed. Insect Hemocytes. 259 - 277.



八字地老虎血球细胞系的形态（300×）

Micrographs of the cell line from *Xestia c-nigrum* hemocyte（NEAU-Xc-960716H）（300×）

A. 离体培养一周的细胞（cells after a week growth *in vitro*）

B. 离体培养一个月的细胞（cells after a month growth *in vitro*）

C. 离体培养两个月的细胞（cells after two months growth *in vitro*）

D. 八字地老虎血球细胞系第 31 代细胞（cells of the 31st generation）